

Docket No. 211223US0X/hc



#9  
MB  
06/19/02

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Bettina MOECKEL, et al.

GAU: 1645

SERIAL NO: 09/938,540

EXAMINER:

FILED: August 27, 2001

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR THE ccpA1 GENE

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number [US App No], filed [US App Dt], is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §120**.
- Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119(e)**.
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119**, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

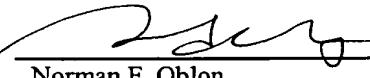
<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Germany	100 42 054.0	August 26, 2000
Germany	101 10 052.3	March 2, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)  
 are submitted herewith  
 will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

  
Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618



22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 10/98)

Roland E. Martin  
Registration No. 48,082

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

09/938,540



**RECEIVED**

JUN 13 2002

TECH CENTER 1600/2900

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 100 42 054.0

**Anmeldetag:** 26. August 2000

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

**Erstanmelder:** Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Neue für das ccpA1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

**IPC:** C 07 H, C 12 N, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 5. Juli 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Sieck".

Sieck

A 9161  
06/00  
CPOV-L  
E1

**Neue für das ccpA1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen**

Gegenstand der Erfindung sind für das ccpA1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, durch Abschwächung des ccpA1-Gens. Das ccpA1-Gen kodiert für das CcpA1-Protein, welches ein Katabolit-Kontroll-Protein A ist.

**Stand der Technik**

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint.
- 15

Werden im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt, sind damit auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das ccpA1-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 25
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 30

- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

5 wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Katabolit-Kontroll-Proteins CcpA1 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine  
10 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1 oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind:

- 20 eine replizierbare DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;
- ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;
- 25 ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz;

und coryneformen Bakterien, in denen das ccpA1-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für das CcpA1-Protein kodieren oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des ccpA1-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das CcpA1-Protein kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders

- 5 zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene

- 10 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der

biologischen Aktivität des CcpA1-Proteins und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und

- 15 besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-

- 20 Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das ccpA1-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

- 25 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise 5 die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden 10 Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere L-Lysin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. 15 Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere 20 der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
25       *Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
            *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

30       oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709  
Brevibacterium flavum FERM-P 1708  
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712  
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463  
5 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464  
Corynebacterium glutamicum DM58-1  
Corynebacterium glutamicum DG52-5  
Corynebacterium glutamicum DSM 5715 und  
Corynebacterium glutamicum DSM 12866

10 Den Erfindern gelang es, das neue, für das CcpA1-Protein kodierende ccpA1-Gen von *C. glutamicum*, welches ein Katabolit-Kontroll-Protein A ist, zu isolieren.

Zur Isolierung des ccpA1-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses

15 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie,

20 Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in

25  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E.*

30 *coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pHG79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 35 11, 291-298).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirsche eignen sich  
5 besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 $\alpha$  (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).

Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen  $\lambda$ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

15 Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.

20 Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

25 Auf diese Weise wurde die neue für das ccpA1-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des  
30 entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des ccpA1-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von 5 SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, 10 die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der 15 Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der 20 Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter 25 Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im 30 Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten 35 Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride

gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d.h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschrifte durch

5 Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflußt bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriften durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited,

10 Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%

15 Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for

20 Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter

25 Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann

35 unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonucleotide

Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte  
5 festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des ccpA1-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des ccpA1-Gens oder die katalytischen  
10 Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen.  
15 Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in  
20 der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)),  
25 Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die

Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydhydratase aus 5 Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und 10 Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit 15 von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu 20 Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung 25 derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und 30 Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von C. glutamicum zu 35 mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung

(„gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen 5 Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder 10 pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994)). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., 15 Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den 20 gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunigan und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS 25 Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"- Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei 30 unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'- Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von *C. 35 glutamicum* verwendet.

Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von C. glutamicum überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden „cross-over“-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden „cross-over“-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 – 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von C. glutamicum durch eine Deletion auszuschalten.

In das ccpA1-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des ccpA1-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphatzzyklus oder des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydripicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Enolase kodierende Gen eno (DE: 19947791.4),
- das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),

- gleichzeitig das für die Tetradihydripicolinat Succinylase kodierende dapD Gen (Wehrmann et al., Journal of Bacteriology 180, 3159-3165 (1998)),
  - gleichzeitig das Gen für die Succinylaminopimelate-Desuccinylase kodierende dapE Gen (Wehrmann et al., Journal of Bacteriology 177: 5991-5993 (1995)),
  - gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 10 • das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))
- gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)),
- 15 • das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Kalinowski et al. (1990), Molecular and General Genetics 224, 317-324; Accession No.P26512),
- das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal (DE: 20 19959328.0, DSM 13115),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Außerdem kann es für die Produktion von Aminosäuren, 25 insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des ccpA1-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

• das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),

• das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),

5 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113),

• das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114)

abzuschwächen.

10 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des ccpA1-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, 15 Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

30 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im

Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, 5 Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum 10 Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff 15 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, 20 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. 25 Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen 30 Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie 35 Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise

eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende 5 Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 10 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem 15 Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed 20 phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von 25 Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring 30 Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus C. glutamicum ATCC 13032

Chromosomal DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei  
5 Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben,  
isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham  
Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung  
Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-  
Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche  
10 Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland,  
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)  
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1  
(Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of  
Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma  
15 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1  
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem  
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)  
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase  
20 dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym  
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.  
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der  
25 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-  
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)  
behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit  
Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La  
30 Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing  
Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al.  
1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in  
10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der

Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektiert.

### Beispiel 2

#### Isolierung und Sequenzierung des Gens ccpA1

10 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-15 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung 20 der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

25 Die DNA des Sequenzervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenzervektor pZero-1 wurde wie 30 von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm

DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50  $\mu$ g/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings 10 of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) 15 verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems 20 (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem 25 zusammenhängenden Contig assembled. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic 30 Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein 35 offenes Leseraster von 1167 bp, welches als ccpA1-Gen

bezeichnet wurde. Das ccpA1-Gen kodiert für ein Polypeptid von 388 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG  
 5 <120> Neue fur das ccpA1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen  
 <130> 000059 BT  
 10 <140>  
 <141>  
 <160> 2  
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 1600  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (225)..(1388)  
 <223> ccpA1-Gen  
 25 <400> 1  
 tgggttactg cccaggcaat gtttggatacg ttttcgggc ttttatcaac agccaataac 60  
 agctcttcg cccattgagg tggaggggct gtttttcat gccgtaagga aagtgcaga 120  
 30 aagtgaaatc aagtggccta gatccattga cacttagact gtgacctagg cttgactttc 180  
 gtgggggagt ggggataagt tcatcttaaa cacaatgcaa tcga ttg cat tta cgt 236  
 Met His Leu Arg  
 35 1  
 tcc tta tcc cac aat agg ggt acc ttc cag aaa gtt ggt gag gag atg 284  
 Ser Leu Ser His Asn Arg Gly Thr Phe Gln Lys Val Gly Glu Glu Met  
 5 10 15 20  
 40 gct tcc gaa acc tcc agc ccg aag aag cgg gcc acc acg ctc aaa gac 332  
 Ala Ser Glu Thr Ser Ser Pro Lys Lys Arg Ala Thr Thr Leu Lys Asp  
 25 30 35  
 45 atc gcg caa gca aca cag ctt tca gtc agc acg gtc tcc cgg gca ttg 380  
 Ile Ala Gln Ala Thr Gln Leu Ser Val Ser Thr Val Ser Arg Ala Leu  
 40 45 50  
 50 gcc aac aac gcg agc att ccg gaa tcc aca cgc atc cga gtc gtt gaa 428  
 Ala Asn Asn Ala Ser Ile Pro Glu Ser Thr Arg Ile Arg Val Val Glu  
 55 60 65  
 55 gct caa aag ctg aac tac cgt ccc aat gcc caa gct cgt gca ttg 476  
 Ala Ala Gln Lys Leu Asn Tyr Arg Pro Asn Ala Gln Ala Arg Ala Leu  
 70 75 80  
 55 cg aag tcg agg aca gac acc atc ggt gtc atc att cca aac att gag 524

	Arg Lys Ser Arg Thr Asp Thr Ile Gly Val Ile Ile Pro Asn Ile Glu	85 90 95 100	
5	aac cca tat ttc tcc tca cta gca gca tcg att caa aaa gct gct cgt Asn Pro Tyr Phe Ser Ser Leu Ala Ala Ser Ile Gln Lys Ala Ala Arg	105 110 115	572
10	gaa gct ggg gtg tcc acc att ttg tcc aac tct gaa gaa aac cca gag Glu Ala Gly Val Ser Thr Ile Leu Ser Asn Ser Glu Glu Asn Pro Glu	120 125 130	620
15	ctg ctt ggt cag act ttg gcg atc atg gat gac caa cgc ctc gat gga Leu Leu Gly Gln Thr Leu Ala Ile Met Asp Asp Gln Arg Leu Asp Gly	135 140 145	668
20	atc atc gtg gtg cca cac att cag tca gag gaa caa gtc act gac ttg Ile Ile Val Val Pro His Ile Gln Ser Glu Glu Gln Val Thr Asp Leu	150 155 160	716
25	gtt aac agg gga gtg cca gta gtg ctg gca gac cgt agt ttt gtt aac Val Asn Arg Gly Val Pro Val Val Leu Ala Asp Arg Ser Phe Val Asn	165 170 175	764
30	tcg tct att cct tcg gtt acc tca gat cca gtt ccg ggc atg act gaa Ser Ser Ile Pro Ser Val Thr Ser Asp Pro Val Pro Gly Met Thr Glu	185 190 195	812
35	gct gtg gac tta ctc ctg gca gct gac gtg caa ttg ggc tac ctt gcc Ala Val Asp Leu Leu Ala Ala Asp Val Gln Leu Gly Tyr Leu Ala	200 205 210	860
40	gac ccg cag gat act tcc act ggt cag ctg cgt ctt aac act ttt gaa Gly Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Gln Leu Arg Leu Asn Thr Phe Glu	215 220 225	908
45	aga cta tgc gtg gac cgc ggc atc gtc gga gca tct gtc tat tac ggt Arg Leu Cys Val Asp Arg Gly Ile Val Gly Ala Ser Val Tyr Tyr Gly	230 235 240	956
50	ggc tac cgc caa gaa tct gga tat gac ggc atc aag gtg ctg atc aag Gly Tyr Arg Gln Glu Ser Gly Tyr Asp Gly Ile Lys Val Leu Ile Lys	245 250 255	1004
55	cag gga gcc aat gcg att atc gct ggt gac tcc atg atg acc atc ggt Gln Gly Ala Asn Ala Ile Ile Ala Gly Asp Ser Met Met Thr Ile Gly	265 270 275	1052
60	gcg ttg ttg gct ctt cat gag atg aat ttg aag atc ggt gag gat gtg Ala Leu Leu Ala Leu His Glu Met Asn Leu Lys Ile Gly Glu Asp Val	280 285 290	1100
65	cag ctc att ggg ttt gat aac aac cca att ttc cgg ctg cag aat cca Gln Leu Ile Gly Phe Asp Asn Asn Pro Ile Phe Arg Leu Gln Asn Pro	295 300 305	1148
70	ccg ctg agc atc att gac cag cac gta caa gag atc ggt aag cgt gcg Pro Leu Ser Ile Ile Asp Gln His Val Gln Glu Ile Gly Lys Arg Ala	310 315 320	1196

ttt gag att ctg cag aag ctg atc aat ggg gac acc gcg caa aaa tct 1244  
 Phe Glu Ile Leu Gln Lys Leu Ile Asn Gly Asp Thr Ala Gln Lys Ser  
 325 330 335 340

5 gtg gtg att cca acg cag ctc agc atc aat gga tca acg gcg gtt tcc 1292  
 Val Val Ile Pro Thr Gln Leu Ser Ile Asn Gly Ser Thr Ala Val Ser  
 345 350 355

10 caa aag gcg gcc gca aag gca gca aaa gca gcc caa aaa gca gcc gcg 1340  
 Gln Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Ala Ala Gln Lys Ala Ala Ala  
 360 365 370

15 aaa gcc gca cag aac acg caa cac gag gtg agc cta gat ggt gaa ctc 1388  
 Lys Ala Ala Gln Asn Thr Gln His Glu Val Ser Leu Asp Gly Glu Leu  
 375 380 385

20 tgaacaagcg cttcatcagc atgatcctgc accaatcctt cagttggata aagtctccaa 1448  
 gtcgttggc ccagtcaacg tcattaatca agtgagcatac gatgttcgcc ctggcagggt 1508  
 gcttgcgctg ttgggtgaaa atggtgccggg taaatctacg ctgatcaaga ttagtgcggg 1568  
 tgtgtatcag cctgatggcg ggcagatttt gg 1600

25 <210> 2  
 <211> 388  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

30 <400> 2  
 Met His Leu Arg Ser Leu Ser His Asn Arg Gly Thr Phe Gln Lys Val  
 1 5 10 15

35 Gly Glu Glu Met Ala Ser Glu Thr Ser Ser Pro Lys Lys Arg Ala Thr  
 20 25 30

40 Thr Leu Lys Asp Ile Ala Gln Ala Thr Gln Leu Ser Val Ser Thr Val  
 35 40 45

Ser Arg Ala Leu Ala Asn Asn Ala Ser Ile Pro Glu Ser Thr Arg Ile  
 50 55 60

45 Arg Val Val Glu Ala Ala Gln Lys Leu Asn Tyr Arg Pro Asn Ala Gln  
 65 70 75 80

Ala Arg Ala Leu Arg Lys Ser Arg Thr Asp Thr Ile Gly Val Ile Ile  
 85 90 95

50 Pro Asn Ile Glu Asn Pro Tyr Phe Ser Ser Leu Ala Ala Ser Ile Gln  
 100 105 110

Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly Val Ser Thr Ile Leu Ser Asn Ser Glu  
 115 120 125

55 Glu Asn Pro Glu Leu Leu Gly Gln Thr Leu Ala Ile Met Asp Asp Gln  
 130 135 140

Arg Leu Asp Gly Ile Ile Val Val Pro His Ile Gln Ser Glu Glu Gln

	145	150	155	160
	Val Thr Asp Leu Val Asn Arg Gly Val	Pro Val Val Leu Ala Asp Arg		
	165	170		175
5	Ser Phe Val Asn Ser Ser Ile Pro Ser Val Thr Ser Asp Pro Val Pro			
	180	185		190
	Gly Met Thr Glu Ala Val Asp Leu Leu Leu Ala Ala Asp Val Gln Leu			
10	195	200		205
	Gly Tyr Leu Ala Gly Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Gln Leu Arg Leu			
	210	215		220
15	Asn Thr Phe Glu Arg Leu Cys Val Asp Arg Gly Ile Val Gly Ala Ser			
	225	230		240
	Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Arg Gln Glu Ser Gly Tyr Asp Gly Ile Lys			
	245	250		255
20	Val Leu Ile Lys Gln Gly Ala Asn Ala Ile Ile Ala Gly Asp Ser Met			
	260	265		270
25	Met Thr Ile Gly Ala Leu Leu Ala Leu His Glu Met Asn Leu Lys Ile			
	275	280		285
	Gly Glu Asp Val Gln Leu Ile Gly Phe Asp Asn Asn Pro Ile Phe Arg			
	290	295		300
30	Leu Gln Asn Pro Pro Leu Ser Ile Ile Asp Gln His Val Gln Glu Ile			
	305	310		320
	Gly Lys Arg Ala Phe Glu Ile Leu Gln Lys Leu Ile Asn Gly Asp Thr			
	325	330		335
35	Ala Gln Lys Ser Val Val Ile Pro Thr Gln Leu Ser Ile Asn Gly Ser			
	340	345		350
	Thr Ala Val Ser Gln Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Ala Ala Gln			
	355	360		365
	Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Gln Asn Thr Gln His Glu Val Ser Leu			
	370	375		380
45	Asp Gly Glu Leu			
	385			

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das ccpA1-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
  - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens zu 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
  - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), oder c), wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Katabolit-Kontroll-Proteins CcpA1 aufweist.
- 20 2. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
  - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
  - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
- 10 6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
- 7. Coryneform Bakterien, in denen das ccpA1-Gen abgeschwächt, bevorzugt ausgeschaltet wird.
- 15 8. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man folgende Schritte durchführt,
  - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das ccpA1-Gen abschwächt,
  - 20 b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
  - c) Isolieren der L-Aminosäure.
- 25 9. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
- 30 10. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

11. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die Expression des (der) Polynukleotids(e), das (die) für das ccpA1-Gen kodiert (kodieren) verringert, insbesondere ausschaltet.
12. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids herabsetzt, für das das Polynukleotid ccpA1 kodiert.
- 10 13. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, Bakterien fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 15 13.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,
- 13.2 das für die Enolase kodierende Gen eno,
- 13.3 das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf,
- 20 13.4 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 13.5 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 13.6 gleichzeitig das für die Tetradihydrodipicolinat Succinylase kodierende dapD Gen,
- 25 13.7 gleichzeitig das Gen für die Succinyldiaminopimelate-Desuccinylase kodierende dapE Gen,
- 13.8 gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 13.9 gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen,

13.10 das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,

13.11 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal verstärkt, bevorzugt überexprimiert.

5 14. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

15.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,

15.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi,

15.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB

15.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2

15 abschwächt.

15. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.

16. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt.

25 17. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für das Katabolit-Kontroll-Protein CcpA1 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des ccpA1-Gens aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Hybridisierung unter einer Stringenz  
entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft isolierte Polynukleotide enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das ccpA1-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.